

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RG



~~PCT RU 98/00143~~
RU 98106976
09/08/98



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ
(РОСПАТЕНТ)

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

рег. No 20/14-389

02 сентября 1998 года

5

СПРАВКА

Федеральный институт промышленной собственности Российского Агентства по патентам и товарным знакам настоящим удостоверяет, что приложенные материалы являются точным воспроизведением первоначального описания, формулы и чертежей (если имеются) заявки на выдачу патента на изобретение N 98106976, поданной в апреле месяце 20 дня 1998 года.

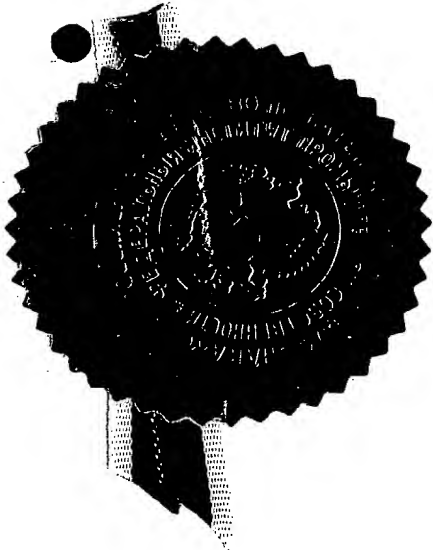
Название изобретения: Способ получения специфической антисыворотки к универсальному опухолевому антигену и способ диагностики злокачественных опухолей с использованием этой антисыворотки.

Заявитель (и): ЕРХОВ Валентин Сергеевич.

Действительные авторы: ЕРХОВ Валентин Сергеевич.

PRIORITY DOCUMENT

REC'D	15 OCT 1998
WIPO	PCT



Уполномоченный заверить копию
заявки на изобретение

Г.Ф. Востриков
Заведующий отделом

Способ получения специфической антисыворотки к
универсальному опухолевому антигену и
способ диагностики злокачественных опухолей
с использованием этой антисыворотки

Изобретение относится к медицине, более точно к онкологии, к ее разделам и к диагностике злокачественных опухолей.

Краткий обзор иммунодиагностики в онкологии показывает следующее.

В 1949 г. Л.А.Зильбер впервые показал, а в 1957 г. Т.Прэн и Дж.Мэйн подтвердили, что клеткам злокачественных опухолей присущи собственные антигены.

Принято выделять 4 группы антигенов (по Абелеву).

1) антигены вирусных опухолей. Они идентичны для любых вирусных опухолей этого вида.

2) антигены канцерогенных опухолей. Они строго индивидуальны как для больных, так и для опухоли.

3) изоантигены трансплантационного типа или ТСТА - опухолеспецифические трансплантационные антигены различны во всех индивидуальных опухолях, индуцированных химическими агентами и тождественны в разных опухолях вызванных одним вирусом.

4) эмбриональные антигены.

В процессе канцерогенеза клетки подвергаются дедифференцировке, приобретая эмбриональный тип строения. В них

часто обнаруживают эмбриональные антигены, специфичные для эмбриональных стадий развития организма. Эти антигены способны иммунизировать организм против опухоли. Наиболее изучены антигены: α -фетопротеин и раковоэмбриональный антиген (РЭА). I-й обнаруживают при первичной карциноме печени, II - при аденокарциноме кишечника, желудка, пищевода или поджелудочной железы.

У детей с нейробластомой, лимфосаркомой или опухолями мозга обнаруживается α_2 - фетопротеин, при раке желудка - фетальный сульфогликопротеин. Эти антигены локализованы в клеточных мембранах, или циркулируют в крови.

Существует специфическая группа антигенов, так называемые гетероспецифические антигены. Их нельзя отнести к чужеродным для данного организма, так как помимо опухоли они присутствуют в других нормальных тканях. К числу их относится почечный антиген, который присутствует в норме в почке и в опухоли печени-гепатоме.

Аденокарцинома почки содержит антиген легких и печени.

Иммунодиагностика злокачественных опухолей основана на индикации в крови больных вышеперечисленных антигенов, антител к ним и выявлении сенсibilизированных к опухолевым антигенам лимфоцитов.

На обнаружении α -фетопротеина основаны методы диагностики лимфосаркомы, нейробластомы (см. На обнаружении антител к РЭА - способ по патенту РФ №2077725, кл. G 01 N 33/53, к вирусу лейкоза - способ по авторскому свидетельству № 1641443, G 01 N 33/53).

На обнаружении гетерогенных антигенов патент РФ №2063768, 1991 г., А 61 К 39/00, патент РФ № 2025734, МПК G 01 N 33/53, авт.свид. СССР №1589215, G 01 N 33/53, авторское свидетельство № 1704087, G 01 N 33/53, авт.свид.№ 170922, авт.свид.№ 1589215.

В авт.свид. №1805392 (G 01 N 33/53) описан способ диагностики рака по антигенам (H_{LA}-B 35) лимфоцитов.

Однако, существующий уровень диагностики таков, что, по сути дела, ни один из тестов не является универсальным. Обнаружение в крови антител является наименее достоверным тестом, т.к. у человека в крови существует очень широкий спектр противоопухолевых и тканевых антител. Не существует методов по выявлению специфического универсального антигена опухолей.

В этом плане перспективно выявление сенсibilизированных лимфоцитов, которые ингибируют рост колоний опухолевых клеток. Однако, они активно только против "своего" вида опухоли.

Таким образом, используемые методы иммунодиагностики опухолей слабо удовлетворяют требованиям первичной диагностики опухолей, совершенно неудовлетворительны в целях скрининга злокачественных новообразований и групп повышенного риска и могут быть применены с известными ограничениями лишь в иммуномониторинге лечения злокачественных опухолей.

Неудачи в существующих методах можно объяснить тем, что используемые в них антисыворотки к опухолевым антигенам строго говоря не являются таковыми.

Задачей настоящего изобретения является получение антисыворотки к универсальному опухолевому антигену, независимо от вида опухоли и органа.

Прототипом как заявленного способа получения специфической антисыворотки, так и способа диагностики с ее использованием выбран способ по патенту РФ №2063768, 1991, МПК А 61 К 39/00, который включает выделение тканей опухоли у умерших лиц, замораживание ее, приготовление клеточной взвеси (диспергирование, декантирование клеток), экстракция антигена из надосадочной жидкости, иммунизацию животных экстрактом, забор крови иммунизированных животных, получение из нее продукта, введение специфической антисыворотки в реакцию с кровью обследуемого, по результатам которой диагностируют опухоль.

Заявленный способ в отличие от известного позволяет получить антисыворотку к идиотопу Т-клеточного рецептора, функционирующего в клетках злокачественных опухолей, то есть антиидиотипическую антиэмбриональную сыворотку, что обеспечивает диагностику всех видов опухолей независимо от их генеза и расположения.

Для осуществления способа получения специфической антисыворотки необходимо провести двухэтапную иммунизацию, выделить эмбрион на стадии Fetus у генетически однородных животных, диспергировать его, подготовить клеточную взвесь. Клеточной взвесью провести иммунизацию животного той же генетической линии. Затем необходимо у иммунизированного животного извлечь клетки селезенки, выделить из них лимфоциты в градиенте плотности фиколл-верографина (1,065-1,079). Этими лимфоцитами следует провести многократную иммунизацию сингенных интактных животных и получить у них стандартным

образом антисыворотку. Эту антисыворотку следует профильтровать через фильтры (например с диаметром пор около 20 мкм.)

Полученная антисыворотка давала реакцию преципитации с различными типами опухолей, полученных от разных людей и в разных органах.

Это позволило на основе полученной антисыворотки разработать метод диагностики злокачественных опухолей.

Известные аналогичные способы диагностики опухолей имеют недостаточно высокую чувствительность и даже у наиболее эффективных из них она не превышает 40-60%. Такая низкая чувствительность известных онкологических иммунодиагностических тестов объясняется тем, что используемые в этих реакциях онкомаркеры, строго говоря, таковыми не являются и представляют собой органоспецифические или онкофетальные антигены, присущие в норме отдельным организмам или системам органов. Это приводит к тому, что ожидаемое универсальное иммунологическое выражение особенностей единого механизма опухолеобразования подменяется частным, присущим не опухолевым состояниям (воспаление, коллагенозы).

Известно, что органоспецифические антигены не являются обязательными для опухолевой трансформации клеток, что и дает такой высокий процент ложноположительных результатов при диагностике злокачественных опухолей.

Предлагаемый метод обнаружения онкомаркера принципиально отличается от ныне используемых тем, что определяет универсальный, высоко специфический антигенный маркер

опухолевого роста, сохраняющийся на всех этапах опухолевой прогрессии.

Метод основан на результатах общетеоретических и экспериментальных работ автора, в которых установлено, что в любых, гистологически различных клетках злокачественных опухолей функционирует устойчивый в опухолевой прогрессии процесс Т-клеточного иммунологического распознавания поверхностных эмбриоспецифических антигенов и что указанный механизм лежит в основе феноменов опухолеобразования (иммортализация и прогрессия).

Для осуществления способа диагностики опухолей необходимо приготовить специфическую антисыворотку предложенным способом ее получения, звести антисыворотку к универсальному опухолевому антигену в иммунологическую реакцию с тканями или физиологическими жидкостями обследуемого, а затем по реакции иммунофлуоресценции или реакции СОЭ диагностировать опухоль. В качестве тканей могут быть использованы ткани опухолей в реакции иммунофлуоресценции или кровь больного в реакции СОЭ.

Диагноз опухоли устанавливают при статистически достоверных различиях результатов реакций между опытной и контрольной пробами.

При этом в случае проведения реакции СОЭ для вычисления различий между опытной и контрольной пробами используют следующую расчетную формулу

$$\alpha = \frac{\left| \left(A - \frac{B_1 + B_2}{2} \right) \right| \times X}{50}$$

где: α - диагностический коэффициент, который при наличии опухоли составляет $\geq 1,5$

A - величина СОЭ в опытной пробе (к цитратной крови обследуемого добавлена антисыворотка к антигену опухоли)

B_1 и B_2 - величина СОЭ в контрольных пробах (к цитратной крови обследуемого добавлена сыворотка того же вида животного, который использовался для получения антисыворотки)

X - наибольшее значение СОЭ в анализе (или в пробе

A или среднее B_1 и B_2 , т.е. $\frac{B_1 + B_2}{2}$).

Пример осуществления способов получения антисыворотки и диагностики злокачественных опухолей.

У крыс линии Wistar весом 300-500 г извлечен эмбрион на стадии Fetus. Ткани его диспергированы в среде 199 в соотношении объемов ткань:среда 199 1:5. Полученной взвесью осуществлялась еженедельная иммунизация intactных крыс линии Wistar. Через 1,5 месяца у забитых крыс извлечена селезенка, диспергирована и в градиенте фиколл-верографина 1,065-1,079 получены лимфоциты.

Из них приготовили взвесь лимфоциты : среда 199 в соотношении 1:1, которую вводили еженедельно другим intactным крысам. После 5 иммунизаций крысы забиты, у них взята кровь, "осветлена", получена из нее антисыворотка, профильтрована, с указанной антисывороткой поставлена реакция СОЭ у нижеприведенных групп больных. При постановке реакции СОЭ использовали стандартный

капилляр с внутренним диаметром около 0,8 мм. К 200 мкл 5% забуференного раствора цитрата натрия добавляют 800 мкл цельной свежей венозной крови, взятой в момент проведения анализа, не позже, чем через 20 сек после забора. От момента смешивания крови с консервантом до проведения анализа не должно пройти более 1 часа. При наличии гемолиза или свертывания анализ ставить нельзя. Из этой крови берут 3 порции по 70 мкл каждая в 3 отдельные пробирки. В одну из них добавляют рабочую (с антителами) в 2 другие - контрольные (без антител) сыворотки по 20 мкл каждая. Сыворотки вводят непосредственно в кровь с консервантом, а не на стенки. Капилляры должны быть одного размера. Смеси перемешивают и заполняют ими капилляры до отметки 5/0. Выдерживают 1 час. Через 1 час снимают показатели и обсчитывают их по вышеприведенной математической формуле.

Указанным способом была получена на крысах линии Wistar антисыворотка, которая использовалась в диагностике заболеваний у конкретных больных.

В анализе с кровью больной К-овой, 1942 г.рождения, d-s: рак прямой кишки получены следующие результаты:

$$A=25, B_1=28, B_2=28$$

По математической формуле найден коэффициент α

$$\alpha = \frac{\left| \left(25 - \frac{28 + 28}{2} \right) \right| \times 28}{50} = 1,7$$

50

1,7 > 1,5, т.е. диагноз злокачественная опухоль подтверждается.

В анализ крови больного с фибромой мочки уха получены следующие результаты:

$$A=10, B_1=12, B_2=12$$

По математической формуле найден коэффициент α

$$\alpha = \frac{\left| \left(10 - \frac{12 + 12}{2} \right) \right| \times 12}{50} = 0,48$$

50

$\alpha < 1,5$, т.е. диагноз незлокачественная опухоль подтверждается.

Ниже даны результаты исследований на группе больных злокачественными опухолями.

РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ -	125 больных, чувствительность - 83,2%
РАК ЛЕГКОГО -	247 больных, чувствительность - 98,1%
РАК ЖЕЛУДКА -	156 больных, чувствительность - 85,2%
РАК ОБОДОЧНОЙ КИШКИ -	23 больных, чувствительность - 82,5%
РАК ПРЯМОЙ КИШКИ -	27 больных, чувствительность - 92,5%
РАК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ -	58 больных, чувствительность - 79,5%
РАК ПОЧКИ -	38 больных, чувствительность - 78,6%
РАК ТЕЛА МАТКИ -	412 больных, чувствительность - 75,0%
РАК ШЕЙКИ МАТКИ -	41 больной, чувствительность - 81,8%

КОНТРОЛЬНАЯ ГРУППА -

Практически здоровые -	400 человек, чувствительность - 5,1%
Кистозно-фиброзная мастопатия -	221 человек, чувствительность - 8,3%
Гастрит -	120 человек, чувствительность - 6,2%

Язвенная болезнь желудка -	62 человека, чувствительность - 8,3%
Коллагенозы -	40 человек, чувствительность - 6,5%
Воспаление легких -	60 человек, чувствительность - 7,2%
(остр. и хрон.)	
Простатиты -	18 человек, чувствительность - 2,1%
Хронические колиты -	115 человек, чувствительность - 4,2%

Закключение: предлагаемый метод имеет чувствительность не менее 85,9% и специфичность не менее 92,4%, то есть является высокоэффективным диагностическим тестом.

Специфическая антисыворотка к универсальному опухолевому антигену в заявке является основным составным компонентом диагностического препарата, реализуемого в России и за рубежом под торговой маркой TURTEST[®].

Формула

1. Способ получения специфической антисыворотки к универсальному опухолевому антигену, включающий выделение тканей, приготовление клеточной взвеси, иммунизацию животных, забор крови иммунизированных животных, получение из нее целевого продукта, отличающийся тем, что проводят многократную иммунизацию, в качестве тканей на I этапе у генетически однородных животных выделяют эмбрион на стадии fetus, готовят клеточную взвесь, после иммунизации которой у животного производят забор клеток селезенки и выделяют из них лимфоциты. Последующие иммунизации животного той же генетической линии проводят взвесью этих лимфоцитов, после чего у животного получают антисыворотку, добавляют в нее клетки интактных органов тех же животных, смесь декантируют, отделяют надосадочную фракцию, фильтруют ее.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что фильтрацию осуществляют через пористые фильтры.

3. Способ диагностики злокачественных опухолей с использованием специфической антисыворотки к универсальному опухолевому антигену, включающий выделение тканей, приготовление клеточной взвеси, иммунизированных животных, получение из нее антисыворотки, введение ее в реакцию с кровью или другими физиологическими жидкостями обследуемого, по результатам которой диагностируют опухоль, отличающийся тем, что проводят многократную иммунизацию, в качестве тканей на I этапе у генетически однородных животных выделяют эмбрион на

стадии fetus, готовят клеточную взвесь, после иммунизации которой у животных производят забор клеток селезенки и выделяют из них лимфоциты. Последующие иммунизации животного той же генетической линии проводят взвесью этих лимфоцитов, после чего у животного получают антисыворотку, добавляют антисыворотку к тканям, крови или другим физиологическим жидкостям обследуемого с последующим учетом результатов по иммунофлуоресценции, в реакциях СОЭ или другими известными методами иммунодетекции и при величинах достоверно отличающихся от контрольных значений диагностируют опухоль.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что результаты реакции СОЭ рассчитывают по формуле

$$\alpha = \frac{\left| \left(A - \frac{B_1 + B_2}{2} \right) \right| \times X}{50}$$

где: α - диагностический коэффициент, который при наличии опухоли составляет $\geq 1,5$

A - величина СОЭ в опытной пробе (к цитратной крови обследуемого добавлена антисыворотка к антигену опухоли)

B_1 и B_2 - величина СОЭ в контрольных пробах (к цитратной крови обследуемого добавлена сыворотка того же вида животного, который использовался для получения антисыворотки)

3

X - наибольшее значение CO₂ в анализе (или в пробе

А или среднее V_1 и V_2 , т.е. $\frac{V_1 + V_2}{2}$).

Реферат

Способ получения специфической антисыворотки к универсальному опухолевому антигену и способ диагностики злокачественных опухолей с использованием этой сыворотки

Изобретение относится к медицине и может быть использовано для получения специфической антисыворотки и иммунодиагностики злокачественных опухолей. Способ получения антисыворотки включает выделение у генетически однородных животных эмбриона на стадии fetus клеточной взвеси. После иммунизации у животного производят забор клеток селезенки, выделяют лимфоциты и проводят иммунизацию животного той же генетической линии взвесью этих лимфоцитов, после чего получают антисыворотку, добавляют в нее клетки интактных органов тех же животных, смесь декантируют, надосадочную жидкость фильтруют. Для диагностики фильтрат добавляют к крови обследуемого, а результат учитывают по иммунофлуоресценции, СОЭ или по другим методам иммунодиагностики и при величинах, достоверно отличающихся от контрольных значений, диагностируют опухоль.

THIS PAGE BLANK (USPTO)